

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Prof. Dr. Raettig

TIEREXPERIMENTELLE PRÜFUNG DES PRÄPARATES
OMNIFLORA AUF SEINE UNSPEZIFISCHE WIRKSAMKEIT
GEGEN INTRAPERITONEALE INFEKTION DER MAUS
MIT DYSPEPSIECOLIBAKTERIEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Harald Prehl

aus Leipzig

1971

Aus dem Robert Koch - Institut, Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung

(Direktor: Prof. Dr. Raettig) _ _ _ _ _

Tierexperimentelle Prüfung des Präparates
OMNIFLORA auf seine unspezifische Wirksamkeit
gegen intraperitoneale Infektion der Maus
mit Dyspepsiecolibakterien.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

H a r a l d P r e h l

aus L e i p z i g

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen RAETTIG

Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard SCHMIDT



Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19. 1. 1971

INHALTSVERZEICHNIS

A.) Aufgabenstellung	1
B.) Einleitung	3
1.) Pathogenese der Säuglingsdyspepsie	3
2.) Die E. coli - Maus - Infektion als tier- experimentelles Colidyspepsiemodell	5
3.) Orale Immunisierung als Grundlage des E. coli - Maus - Modells	9
4.) Mit dem E. coli - Maus - Modell erzielt- e Ergebnisse hinsichtlich einer Coli- dyspepsieprophylaxe	15
5.) Das Verhalten des Bact. bifidum gegen- über Colidyspepsien aus pädiatrischer Sicht	
C.) Versuche	
I.) Versuchsreihe: Feststellung der unterschied- lichen Immunität gegen intraperitone- ale Colidyspepsieinfektionen am E. coli - Maus - Modell, die durch homo- loge, polyvalente und unspezifische (OMNIFLORA) Impfstoffe erreicht werden können	20
A) Material und Methoden	21
B) Versuchsdurchführung	24
C) Ergebnisse	24

II. Versuchsreihe: Feststellung des Immun-	
schutzes gegen intraperitoneale	
Colidyspepsieinfektionen am E. coli	
Maus - Modell, der durch lyophili-	
sierte Bifidusimpfstoffe erreicht	
werden kann.	31

A) Material und Methoden	31
B) Versuchsdurchführung	32
C) Ergebnisse	32

III. Versuchsreihe: Feststellung der Immuni-	
tät gegen intraperitoneale Coli-	
dyspepsieinfektionen am E . coli -	
Maus - Modell, der durch lyophili-	
sierte und gleichzeitig hitzeinak-	
tivierte Bifidusimpfstoffe erreicht	
werden kann.	38

A) Material und Methoden und Versuchs-	
durchführung	38
B) Ergebnisse	38

IV. Versuchsreihe: Prüfung, ob die bifidogene	
Wirksamkeit gegen intraperitoneale	
Colidyspepsieinfektionen am E. coli -	
Maus - Modell antigengebunden ist.	43

D.) Diskussion	44
1.) Zusammenfassung der erzielten und bereits diskutierten Ergebnisse	44
2.) Diskussion über die nachgewiesenen bifidogene Wirksamkeit	46
E.) Literaturverzeichnis	50
F.) Zusammenfassung	61



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aufgabenstellung

Die Erkenntnisse HAENELS (I9,20,2I) über die normale Zusammensetzung der Darmflora, sowie die Erarbeitung neuer Züchtungsmethoden des *Lactobacillus bifidus* (KLUDAS 30) waren die Voraussetzung für die Entwicklung des Präparates "OMNIFLORA" der Firma MED, das eine Darmbakteriensubstitution auf breiter physiologischer Grundlage gestattet. Bei dem erwähnten Präparat handelt es sich um ein Gemisch lebender, lyophilisierter Reinkulturen von *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus bifidus* (Synonym *Bacterium bididum* = *Bact. bifidum* = *Bac. bifidus*) in darmlöslichen Kapseln. Die Wirksamkeit dieser Keimkombination bei Magen- Darmkrankheiten wie z. B. Colitiden, Gastroenteritiden, postantibiotischen Enterocolitiden, Strahlenschäden und Darmstörungen nach postoperativen Eingriffen am Magen- Darmkanal konnte an einem großen klinischen Krankengut gesichert werden. Die statistische Gesamtauswertung dieser mit OMNIFLORA behandelten und publizierten Krankheitsfälle ergibt eine Erfolgsquote von 80,9 % (23). Ähnliche Zahlen errechnen sich für die Behandlung dyspeptischer Zustände, Dysfermentien, Meteorismus Roemheld, chronischer Obstipation, Cholecystopathien und Subacidität des Magens. Die eindeutige klinische Sicherung der Wirksamkeit dieses Präparates läßt nicht vermuten, daß über den Wir-

kungsmechanismus völlige Unklarheit herrscht. Die Ursache hierfür ist darin zu suchen, daß eine eindeutige Antwort auf die Frage nach der Funktion der Darmflora noch nicht gegeben werden kann. Vor allem besteht Unklarheit über die Bedeutung des *Lactobacillus bifidus*, der erst in den letzten Jahren als der wesentliche Bestandteil einer normalen Darmflora erkannt wurde. Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, tierexperimentell zu prüfen, ob die in dem Präparat OMNIFLORA vorliegende Keimkombination zur Prophylaxe von infektiösen Colidyspepsien herangezogen werden kann. Als Arbeitsgrundlage soll das *E. coli*-Maus-Modell dienen, da es sich in letzter Zeit als Dyspepsieversuchsmodell durchgesetzt hat. Die Überlegung, daß OMNIFLORA gegen Säuglingsdyspepsien wirksam sein könnte, ergibt sich aus mehreren publizierten Versuchen, in denen nachgewiesen wurde, daß mit Hilfe oraler Gaben von inaktivierten Dyspepsiecoliimpfstoffen, Infektionsrate und Infektionsdauer von Colidyspepsien beim Tier, sowie beim Menschen gesenkt werden konnten.

Aber nicht nur auf den im OMNIFLORA zu findenden Normalcolianteil stützt sich die Vermutung der Wirksamkeit des Präparates gegenüber Dyspepsiecoliinfektionen, sondern auch auf den das Präparat beinhaltenden *Bifidus*anteil. Bei positiven Ergebnis soll der Versuch einer Klärung des Wirkungsmechanismus unternommen werden.

Einleitung

Trotz 30- jähriger intensiver Bemühungen ist es bis heute noch nicht gelungen, den Pathomechanismus der Colidyspepsie bei Säuglingen aufzuklären. Die bisher vorliegenden Ergebnisse sollen im folgenden zusammengefaßt werden:

KETY (27) infizierte keimfreie Mäuse oral mit Dyspepsie- Colibakterien (DC - Bakterien). Er beobachtete dabei, daß es 1 - 2 Stunden nach der Infektion zu einer primären Ausscheidung kam. 4 - 14 Stunden nach gesetzter Infektion gelang es ihm, aus den Mesenteriallymphknoten DC - Keime anzuzüchten. Bereits nach 12 Stunden beobachtete er eine sekundäre Reinfektion des Darmes von den Lymphknoten her. Er unterscheidet deshalb in der Pathokinetik der Dyspepsie die folgenden 3 Stadien: 1.) Stadium der primären Ausscheidung, 2.) Stadium der Invasion, 3.) Stadium der Reinfektion. Weiterhin haben RAUSS und KETY (60) festgestellt, daß es nur dann zu einer Implantation von Dyspepsiecolikeimen im Intestinaltrakt der Maus kommt, wenn vor der Implantation keine Coliflora im Intestinaltrakt anzutreffen war. Diesen Nachweis erbrachte er dadurch, daß er ausgewachsene Mäuse mit Streptomycin behandelte und danach lebende Dyspepsiecolikeime verfütterte. Der oral verimpfte Dyspepsiecolikeim ging nur bei den mit Streptomycin behandelten Tieren an, nicht bei den Kontrollen. Nach der Neube-

siedelung des streptomycinbehandelten Intestinaltraktes der Maus, konnte die Coliflore auch durch permanente Zufuhr eines anderen DC - Keimes nicht verdrängt werden. Oral eingebrachte hochschützende Immunseren konnten eine Implantation in den keimfreien Darm nicht verhindern, genausowenig wie eine vorangegangene aktive Schutzimpfung. KÉTY folgte aus seinen Beobachtungen, daß die Empfänglichkeit für einen Dyspepsiecoliinfect von dem Reifezustand des Magen- Darmtraktes abhängig ist.

Die Beobachtungen KÉTYs, daß oral verfütterte Colikeime im Blut, wenn auch nur für wenige Stunden, auftreten, wurde von PETER (49) bestätigt. KÜHN (34) dagegen ist es nicht gelungen, in dem Sektionsmaterial von 28 Säuglingen, die an Dyspepsie und zusätzlich anderen Erkrankungen verstorben sind, auf bakteriologischem, histologischem und fluoreszenzmikroskopischem Weg, DC - Keime außerhalb des Darmes, der Submucosa oder Mucosa nachzuweisen.

OCKLITZ und MOCHMANN (46) stimmen mit KÉTY überein, daß die Dyspepsie - Morbidität vom Reifezustand des Darmes abhängig ist. Sie weisen darauf hin, daß die Coliantikörper zu den 19 - S Gammaglobulinen gehören (IgM), die nicht placental übertragen werden können. Aus diesem Grund ist die Dyspepsiegefahr bei Säuglingen in den ersten Lebenswochen am größten. Da DC - Antikörper bei Schulkindern zu 90 % nachweisbar sind, vermuten sie eine lokale

Immunisierung durch Partialantigene anderer Enterobacteriaceae oder eine akute Immunisierung unter der Erkrankung.

Pathochemisch sind folgende Beobachtungen gemacht worden und stehen zur Diskussion: Während OCKLITZ (48) die stärkere Exo- und Endotoxinproduktion der pathogenen Colistämme im Vergleich zu den Normalcolistämmen für das pathogenetische Substrat der Dyspepsie hält, sieht WESTPHAL (70) die auslösende Ursache in den beiden Zucker Colitose und Fucose der determinanten Gruppe der Antigene pathogener Colitypen.

Von anderer Seite wird den Dyspepsiecolikeimen, im Gegensatz zu den Normalcolitypen, die Fähigkeit zugesprochen, auf Grund ihres Exotoxingehaltes die Epithelschranke des Darmes zu überwinden.

Die Schwierigkeit in der Erforschung der Pathogenese ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß kein experimentelles Infektionsmodell bekannt ist, bei dem die der Säuglingsdyspepsie entsprechenden Symptome auftreten. GOLDSCHMIDT (I6) führte orale Infektionsversuche mit Dyspepsiecolistämmen an Mäusen, Meerschweinchen sowie einem jungen Halbaffen durch.

BRAY (4) untersuchte die Pathogenität von Enteritiscolitypen an säugenden Mäusen, Hühnern und Kaninchen. Er injizierte lebende Kulturen; jedoch mit negativem Resultat. GILES und SANGSTER (I4,I5) wiederholten Infekti-

onsversuche an neugeborenen Küken und Mäusen, indem sie den Stamm oral und rektal instillierten. Die Autoren vermißten bei den Versuchstieren jegliche Krankheiterscheinungen, beobachteten jedoch bei intravenöser Injektion von E. coli O 111 : B 4 eine schwere Symptomatik. Diese Ergebnisse konnten von BRAUN (5,6) nicht bestätigt werden. TAYLOR (66) berichtete über Versuche zur Pathogenität von E. coli O 111 : B₄ im Vergleich zu Normalcolistämmen bei Meerschweinchen, Mäusen, Kaninchen und Affen. Bei allen Colistämmen ergaben sich dieselben Resultate, so daß die Dyspepsiecolibakterien nicht von denen anderer Provenienz unterschieden werden konnten. Die Versuche wurden von BRAUN an Mäusen wiederholt und konnten bestätigt werden. An jungen Katzen konnte KREPPLER und ZISCHKA (32) durch orale Verfütterung von Dyspepsiecolibakterien O 111 : B₄ der Säuglingsdyspepsie analoge Symptome auslösen. Die Tiere zeigten während der 14- tägigen oralen Verfütterung der Dyspepsiecolistämme eine Blähung des Abdomens, ein Tier, das von vornherein schwächer war, starb 10 Tage nach Absetzen der Verfütterung.

KÉTY (28) behandelte trächtige Mäuse mit Streptomycin und beseitigte damit deren Coliflora. Die später geborenen Säuglingsmäuse wurden isoliert und steril aufgezogen. In Gruppen wurden sie in der ersten Lebenswoche, einmal an verschiedenen Tagen, mit E. coli (DC) O 101 : K30

oral infiziert. Er fand, daß die zwischen den 2,5 - 3,5-ten Lebenstag infizierten Mäuse innerhalb von Stunden verstarben, ohne ersichtliche klinische Symptome. Die zwischen dem 3,5 und 5,5-ten Lebenstag infizierten Tiere zeigten eine längere Überlebenszeit. Die länger Überlebenden Tiere dieser Versuchsgruppe zeigten Durchfallsymptome, Gewichtstillstand und Atrophie. Die Mortalität in dieser Versuchsgruppe betrug nur noch 37 % gegenüber 100 % in der ersten Versuchsgruppe. Tiere, die nach dem 7,5-ten Tag infiziert wurden, zeigten überhaupt keine Symptome mehr. KÉTY schloß aus seinen Versuchen, daß sich Morbidität und Mortalität oral infizierter neugeborener Mäuse mit dem Dyspepsiecolistamm O 101 : K 30 umgekehrt proportional zu der Anzahl der Lebenstage verhält.

GWAN (17) führte 1938 Versuche an Kaninchen durch, die zeigten, daß Colibakterien die intraperitoneal oder intravenös verabreicht wurden, tödlich sein können. Es gelang ihm auch nachzuweisen, daß Versuchstiere durch orale Gabe von Colibakterien vor einer tödlichen intraperitonealen i.v. Gabe mindestens 40 Tage geschützt werden können. Antikörper waren nur in unterschiedlichem Maße nachweisbar. Der erzielte Schutz war stammspezifisch, bei polyvalenter Immunisierung aber auch gegenüber einer heterologen Infektion feststellbar. In einer 2. Mitteilung konnte GWAN (18) zeigen, daß nach oraler polyva-

lenter *E. coli* Immunisierung durch zahlreiche i.v. Reinjektionen mit dem homologen Keim nicht nur die Antikörper des speziellen Keimes ansteigen, sondern die Gesamtheit der durch die polyvalente Immunisierung induzierten Antikörper. Durch wiederholte i.v. Injektionen erhielt er ein polyvalentes Coliantiserum, das sich durch " kräftige neutralisierende, praeventive, kurative, antitoxische und agglutinierende Eigenschaften auszeichnete ". Flexner- Proteus- und Friedländer- Bakterien wurden ebenfalls agglutiniert.

LODENKÄMPER (36) prüfte als nächster die Möglichkeit eines Impfschutzes durch orale Dyspepsie- Gaben gegen eine intraperitoneale Dyspepsiecoliinfektion. Es gelang ihm, den Nachweis tierexperimentell und serologisch zu erbringen. Kurz darauf bestätigte PIRINGER (50) den durch orale Immunisierung erzeugten Schutz gegen eine hochvirulente intraperitoneale Infektionsbelastung bei der Maus. STELLMACHER und MÜLLER (64) waren die nächsten, denen das *E. coli*- Infektionsmodell als Arbeitsgrundlage diente. OCKLITZ und Mitarbeiter hatten in 10 Mitteilungen einen Schutz nach oraler Gabe von mono- und polyvalenten Na- Desoxycholatextrakten von Dyspepsiecolibakterien gegenüber einer i.p. Belastung nachweisen können (*E. coli*- Infektionsmodell = Mäuse werden durch Verabreichung von Dyspepsie-

colibakterien an 10 aufeinanderfolgenden Tagen oral immunisiert und 10 Tage nach abgeschlossener Immunisierung zur Prüfung des eingetretenen Impfschutzes, intraperitoneal infiziert). LIETZ und RAETTIG (35) verwandten ebenfalls das E. coli - Maus - Modell und prüften die Antikörperbildung nach homologer und heterologer i.p. Belastung nach vorangegangener monovalenter Immunisierung. Bei allen diesen Arbeiten stellte sich heraus, daß bei der Maus durch intraperitoneale Injektion des Dyspepsiecolistammes 2380 (E. coli 2380 = E. coli O 111 : B₄ : H₁₂) am sichersten eine reproduzierbare Infektion gesetzt werden kann.

Dieses Tiermodell stellt kein Analogum zur Symptomatik und zum Infektionsmodus der Säuglingsdyspepsie dar. Es hat sich jedoch als Arbeitsgrundlage, aus Ermangelung eines besseren Versuchsmodells, als tierexperimentelles Dyspepsieversuchsmodell durchgesetzt. Die Grundlage des E. coli - Maus - Modell stellt die orale Immu-

nisierung dar.

Daß es bei der oralen Immunisierung gleichzeitig zu einer humoralen und lokalen, cellulären Immunantwort kommt, war zahlreiche Jahre umstritten und konnte erst in den letzten Jahren, hauptsächlich durch die Arbeiten von RAETTIG (58) erklärt werden. Die Uneinigkeit war bedingt durch die Vertreter zweier Schulen, die von verschiedenen theoretischen Grundlagen ausgingen.

Während die deutsche Schule der Immunologie, die von Paul EHRLICH entwickelte Seitenkettentheorie und damit den Nachweis von Antikörpern als Zeichen der Immunität forderte, stand in der französischen Schule die Phagocytenlehre METTSCHNIKOFFS und vor allem deren Weiterentwicklung durch METTSCHNIKOFFS Schüler, BORDET und BESREDKA (2), im Vordergrund (59).

Nach BESREDKA (2) erlaubt nur eine strenge Affinität zwischen einer Gewebeart und den Eigenschaften eines Keimes das Eindringen desselben in den Makroorganismus. Er erklärte den Zustand der Immunität mit einer organspezifischen, cellulär gebundenen Änderung der Affinität des betreffenden Gewebes zu dem Keim. Somit war der Kontakt zwischen Erreger und der für den Keim entsprechenden Eintrittspforte Voraussetzung einer erfolgsversprechenden Immunität. Der Impfstoff wurde deshalb lokal verabreicht, also auf

inhalatorischem, oralem, kutanem, rektalem oder vaginalem Wege.

Eine erfolgreiche lokale Immunisierung konnte zwar im Belastungsversuch, d.h. durch Infektion von immunisierten Tieren im Vergleich zu nicht immunisierten Kontrolltieren, stets durch eine signifikante Morbiditäts- und Mortalitätsenkung nachgewiesen werden, jedoch war der Nachweis von Antikörpern nur unregelmäßig oder überhaupt nicht zu erbringen.

Demgegenüber verabreichten die Anhänger der deutschen Schule ihren Impfstoff durch Verletzung des Integuments des Makroorganismus auf intrakutanem, subkutanem und intravenösen Weg und erzielten damit sicher die Bildung von Antikörpern, wie sie zum Nachweis einer erfolgreichen Immunität gefordert wurden. Die humorale Theorie der Immunität stand hier im Mittelpunkt.

Die Unversöhnlichkeit beider Theorien konnte erst in den letzten Jahren abgebaut werden. Zwar hatte schon BRÜCKNER (11) im Jahre 1910 Mäusen Paratyphus - B - Bakterien oral verfüttert und diese später subkutan infiziert und einen signifikanten Schutz nachweisen können, doch hatte sich seine Schlußfolgerung, daß hier nicht nur eine lokale Immunität bestanden haben kann, sondern wegen der Wahl des Infektionsweges und des nachgewiesenen Schutzes auch eine allgemeine Im-

munität vorgelegen haben muß, nicht durchgesetzt. Erst JANDEL (25,26), sowie LIETZ und RAETTIG (35) wiederholten diese Versuchsanordnung, indem sie *S. typhi*, *S. enteritidis* sowie *E. coli* oral verabreichten und die Tiere später i.p. infizierten. Auch hier konnte gegenüber der Kontrollgruppe ein hoher signifikanter Schutz nachgewiesen werden. Beide Autoren schlossen aus ihren Versuchen, daß nach der oralen Immunisierung nicht nur eine lokale Immunität vorliegen kann, sondern daß auch ein allgemeiner Abwehrprozeß in Gang gesetzt worden sein muß. In der Zwischenzeit weiß man, daß die orale Applikation von Keimen über den Herbst - Effekt zu einem Kontakt zwischen Antigen und immunkompetenter Zelle führt. Dieser Kontakt führt, wie RAETTIG und LIETZ ausführten und RAETTIG und BUSE (57) bestätigen konnten, zur Induktion der spezifischen Antikörperbildung, ohne daß nach dem Immunisierungsvorgang Antikörper in größeren Mengen gebildet werden. Diese stehen aber sofort nach erfolgter homologer Infektion zur Verfügung.

Aus der Literatur über die orale Immunisierung geht hervor, daß für den Erfolg des Belastungsversuches Impfdosis und Impfrhythmus von hervorragender Bedeutung sind (55). Eine 5- bis 15- malige Anwendung soll in den meisten entwickelten Infektionsmodellen

einen optimalen Schutz gewährleisten. Für das E. coli - Maus - Modell wurde von PIRINGER, LIETZ und RAETTIG eine 10- malige Gabe des Impfstoffes bestimmt.

Über die unspezifische orale Immunisierung liegen bedeutend weniger Arbeiten vor als über die Spezifische. Es läßt sich jedoch in allen veröffentlichten Arbeiten ein deutlicher Schutz auch gegenüber einer heterologen Infektion erkennen. Zahlreiche Hypothesen liegen vor. Für das Salmonella typhi - Enterititis - Modell wird von JANDEL (25) und RAETTIG (53,54) das gemeinsame O - Antigen verantwortlich gemacht, also eine Kreuzimmunität. JANDEL (26) wies nach, daß Mäuse mit E. coli - Impfstoffen gegen eine orale Enterititisinfection signifikant geschützt werden können. Da der Schutz gegenüber einer i.p. - Belastung nicht nachweisbar ist, vermutet er den Schutz gegen eine heterologe Infektion in der Darmwand. Es ist ihm auch gelungen, durch Verfütterung von Eiklar an Eiweiß - frei aufgezogene Mäuse diese vor einer Enterititisinfection zu schützen. Er führt diesen Schutz auf Resistenzschwankungen

des Darmes zurück, die in der Ernährungsart begründet sind, bezweifelt aber die Übertragung dieses Ergebnisses auf den Menschen.

Für den unspezifischen Schutzmechanismus werden von anderen Autoren Opsonine und Coproantikörper verantwortlich gemacht. TORIKATA und IMAIZUMI (68) erbrachten den Nachweis, daß es nach oraler Immunisierung mit E. coli zu einer Erhöhung des homologen und heterologen Opsonins im Magen- Darmtrakt kommt. Die Opsoninerhöhung im Intestinaltrakt war höher als die im Serum. FRETER (13) gibt eine Zusammenstellung der über die Coproantikörper erschienenen Arbeiten und kommt zu dem Schluß, daß die bis dahin erzielten unterschiedlichen Resultate auf die Schwierigkeiten und die Unzulänglichkeiten der Nachweismethoden zurückzuführen gewesen sind. Gleichzeitig berichtet er über einen Feldversuch, in dem Coproantikörper im Stuhl von Versuchspersonen sicher nachgewiesen werden konnten.

RAETTIG (51,56) immunisierte Mäuse mit hitzeinaktivierten Col. SK - Viren sowie kommerziellen trivalenten Salk - Impfstoff, als auch mit hitzeinaktivierten S. typhi murium und konnte feststellen, daß gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Mortalitätssenkung nach oraler Col. SK - Infektion bestand. Daß auch S. typhi - murium gegen eine Col. SK -

Virus Infektion schützt, könnte mit der Feststellung von STINEBRING (65) erklärt werden, der bei Mäusen nach i.v. Infektion mit *Brucella abortus*, *S. typhi* - *murium* und *E. coli* - Endotoxinen Stoffe isolieren konnte, die Eigenschaften des Interferons zeigten. Eine weitere Erklärung für das unspezifische Abwehrsystem kann neben den bisher geschilderten Möglichkeiten im Properdinsystem (22) gesehen werden.

Am *E. coli* - Maus- Modell wurden Belastungsversuche mit homologer und heterologer Infektion durchgeführt. Bei den homolog infizierten Tieren konnte jeweils eine signifikante Mortalitätssenkung mit hohem Wirkungsgrad gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Bei den heterolog infizierten Tieren fiel das Ergebnis schlechter aus. LIETZ und RAETTIG gelang es durch orale Immunisierung mit *E. coli* O 125 : B 15 und nachfolgender *E. coli* O 111 : B₄ (*Coli* 2380) - Infektion einen signifikanten Schutz gegenüber einer heterologen Infektion nachzuweisen, doch liegt der Wirkungsindex um 49,7 niedriger als bei den spezifisch

immunisierten Tieren. MOCHMANN (43) benutzte zur Immunisierung Natriumdesoxycholat - Extrakte aus 4 Dyspepsie - Coli O - Antigenen und infizierte heterolog mit E. coli 2380. Auch hier wurde ein nur geringer, aber z. T. signifikanter Infektionsschutz nachgewiesen. Bei bivalenter Immunisierung mit Desoxycholat-extrakten der Antigene DC O 111 bzw. DC O 55 und kreuzweiser bzw. kombinierter intraperitonealer Belastung zeigte sich eine gute Schutzwirkung. Der erzielte Schutz wird von den Autoren als gruppenspezifisch angesehen. In einer weiteren Mitteilung konnte die Arbeitsgruppe um MOCHMANN (42) diese Aussage mit Hilfe der indirekten Hämagglutinationsreaktion bekräftigen. SCHREIBER (63) gelang es in einem breit angelegten Feldversuch an 4 Berliner Kinderkliniken, im doppelten Blindversuch, einen signifikanten Schutz mit einem polyvalenten Dyspepsiecoli - Impfstoff gegenüber Dyspepsien "wahrscheinlich infektiöser Ätiologie und Virus-Enteritiden" nachzuweisen.

Während die Immunologie die hier geschilderten Ergebnisse im Rahmen der Entwicklung einer Dyspepsieprophylaxe erarbeitet hat, erwartet man von pädiatrischer Seite eine völlig anders geartete Lösung des Problems. Empirisch erworbene und anerkannte Lehrmeinung ist es heute, daß mit roher Frauenmilch ernährte Säuglinge besser gedeihen als mit Kuhmilch ernährte

Säuglinge. Ein Teil der sich mit diesem Problem beschäftigten Autoren sehen die "resistenzsteigernde Wirkung" in einem direkten Einfluß der Frauenmilch auf den Säuglingsorganismus, ein anderer Teil führt die Wirkung auf die spezifische, nur bei frischer Frauenmilchernährung im Säuglingsdarm entstehende charakteristische Bifidus - Darmflora zurück.

HAENEL (20), der sich mit der Mikrobiozönose des mit Brust- und Kuhmilch ernährten Säuglings , sowie des Erwachsenen befaßte, stellte fest, daß die Bifidusgruppe in allen Fällen den Hauptteil der züchtbaren Keime bildet. Danach folgen putride Keime (putride Keime = Darmkeime systematisch unterschiedlicher Keimgruppen, die auf Grund ihrer Fermentleistungen zur Proteolyse, zu einer "Keimgruppe" zusammengefaßt werden). Er beobachtete, daß nach Absetzen reiner Brustnahrung die putriden Keime drastisch in Erscheinung traten. Die Bifiduszahlen sanken nach künstlicher Ernährung signifikant ab, blieben aber die dominierende Gruppe. Die Colizahlen nahmen nach Umstellung auf Kuhmilch signifikant zu. HAENEL sieht die Wirkung der Muttermilch in der Hemmung putriden Keime.

Andere Autoren kamen aus kasuistischen Beobachtungen zu der Ansicht, daß zwischen der besonders stark ausgebildeten Bifidus - Darmflora der Brustmilch ernährten Säuglinge und E. coli ein Antagonismus besteht.

KUNDRATITZ und GROSS (33) schilderten Beobachtungen an Säuglingen, die sie während einer Dyspepsieepidemie am Mautner - Markhoffschen Kinderspital der Stadt Wien machten. Die Autoren stellten fest, daß unter 72 erkrankten Patienten nur 2 an der Brust ernährte Säuglinge waren. Die Dyspepsie konnte in beiden Fällen nur serologisch (DC O 111 : B 4) festgestellt werden, denn als Gesamtsymptomatik zeigte sich nur ein einziger dünner Stuhl. Weiterhin konnten sie feststellen, daß das Wiederauftreten einer Bifidusflora mit einer sichtlichen Besserung der erkrankten Kinder einherging. KREPLER und ZISCHKA (32) konnten unter 190 dyspeptischen Säuglingen nicht einen Säugling mit einer ausgeprägten Bifidusflora finden. KIRBY (29) beobachtete bei Säuglingen, die alle dem gleichen Infektionsrisiko während der Hospitalisierung ausgesetzt waren, daß nur 8,2 % der mit Brustmilch ernährten Säuglinge erkrankten, gegenüber 67 % der mit Kuhmilch ernährten. HOFFMANN und SAUERBREI (24) stellten unter 309 mit roher Frauenmilch ernährter Frühgeborenen nur 5 mit einer bakteriologisch gesicherten Dyspepsie fest, während unter den 350 mit abgekochter Frauenmilch ernährten Säuglingen 43 an einer Dyspepsiecolienteritis erkrankten. MAYER (38,39,40,41) ist es gelungen mit Hilfe einer künstlich angesiedelten Bact. bifidum - Darmflora durch eine Lactana B - Bifidusmilchernährung

eine Soorenteritis und Staphylokokkenenteritis zu verdrängen.

Nicht nur die klinischen Erfahrungen bekräftigen den von ADAM (1) zuerst vermuteten Antagonismus der Frauenmilch bzw. des Bact. bifidum gegenüber E. coli, sondern auch in vitro - Versuche. BIRKENBACH (3) und MAYER (40) gelang es, durch gleichzeitige Überimpfung von Bacterium bifidum - Kulturen, die an anaerobe Bedingungen adaptiert wurden, auf Dyspepsiecoli-, Typhus-, Paratyphusbakterien und Staphylokokken - Kulturen eine Wachstumshemmung der zuletzt genannten Mikroorganismen nachzuweisen.

Ob zwischen Bact. bifidum und E. coli ein Antagonismus besteht, wurde bisher tierexperimentell nicht geklärt.

I. Versuchsreihe

A) Material und Methoden

1) Versuchstiere

Für die Versuche wurden weiße NMRI Mäuse (Naval Medical Research Institut) benutzt. Es handelte sich um Tiere beiderlei Geschlechtes mit einem durchschnittlichen Gewicht von 14 - 18 g zu Versuchsbeginn. Die Tiere wurden zu etwa 25 Tieren in Plastikkäfigen gehalten und mit Altromin und Leitungswasser ernährt. Alle Tiere waren denselben Bedingungen ausgesetzt.

2) Impfstoffe

a) Der Dyspepsiecolistamm 2380 (Rowely) (homologer Impfstoff) der im Robert Koch - Institut ständig auf seine Virulenz hin untersucht wird, wurde auf große Agarschalen verimpft, bei 37°C über 24 Std. bebrütet und dann mit phosphatgepufferter phys. NaCl - Lösung (ph = 7,4) abgeschwemmt. Die Keimzahl der Abschwemmung betrug durchschnittlich $1 \cdot 10^{11}$ Keime/ml. Die Abschwemmung wurde 1 : 100 verdünnt und die Keime durch Erhitzen auf 100°C für 3 Minuten inaktiviert. Anschließend wurde auf Sterilität geprüft. Die mit diesem Impfstoff immunisierte Tiereinheit wird im Folgenden als "E. coli 2380 Kollektiv" bezeichnet.

b) Der polyvalente Coliimpfstoff, der von den BEHRING - Werken Marburg/Lahn zur Verfügung gestellt wurde, enthielt die folgenden inaktivierten Keime:

1) O26 : B 6 2) O 111 : B 4 3) O 128 : B 14 : H 2
4) O55 : B 5 5) O 111 : B14 6) O 125 : B 15 : H19

Die Inaktivierung erfolgte im Fermenter mit 0,3 Vol% Formalin einer 35% igen Formaldehydlösung. Anschließend wurden die Keime ausgewaschen, getrocknet und in Kapseln gefüllt. Eine Kapsel enthält 10^{11} Keime und wurde in 40 ml physiologischer NaCl - Lösung gelöst. Somit enthielt 1 ml Kapselaufschwemmung $2,5 \cdot 10^9$ Keime. Die

Gesamtheit der mit diesen Impfstoff immunisierten Tiere wird als "Coli - BEHRING - Kollektiv" im folgenden bezeichnet.

c) Das Lyophilisationsprodukt "OMNIFLORA" der Firma MED setzt sich zusammen aus den apathogenen Stämmen E. coli Nr. 007, dem Lactobacillus bifidus longum var. longum B (die Bestimmung des Bacterium bifidum wurde von Herrn Dr. HEISE der Firma MED nach dem von MITSUOKA (67) angegebenen Differenzierungsschema durchgeführt), sowie Lactobacillus acidophilus. Die verwendeten Chargen enthielten folgende Keimzahlen je Kapsel:

Charge 9325:	L. acidophilus	300 Millionen
	L. bifidus	39 Millionen
	E. coli	1,02 Milliarden
Charge 9308:	L. acidophilus	240 Millionen
	L. bifidus	600 Tausend
	E. coli	150 Millionen
Charge 9214:	L. acidophilus	358,5 Millionen
	L. bifidus	75 Tausend
	E. coli	13 500
Charge 9402:	L. acidophilus	6 Millionen
	L. bifidus	3 Millionen
	E. coli	6 Millionen

Da es sich bei dem Medikament OMNIFLORA um ein Lyophilisationsprodukt handelt, muß dessen Aufschwemmung aus wechselnden Anteilen lebender und abgetöteter Mikroorganismen bestehen. Die Kapseln wurden in physiologischer NaCl gelöst. Die Aufschwemmung erfolgte bei:

Charge 9325: 120 Kpseln wurden in 150 ml NaCl gelöst.
 1 ml Aufschwemmung enthielt demnach folgende Keimzahlen

E. coli	= 8,2 · 10 ⁸ Keime/ml
L. bifidus	= 3,12 · 10 ⁷ Keime/ml
L. acidophilus	= 2,4 · 10 ⁸ Keime/ml

Charge 9214: 20 Kapseln wurden in 150 ml physiologi-

scher NaCl gelöst. Die Keimzahlen eines ml betragen:

E. coli = 1,1 · 10³ Keime/ml

L. bifidus = 1 · 10⁴ Keime/ml

L. acidophilus = 4,8 · 10⁸ Keime/ml

Charge 9308: 20 Kapseln wurden in 150 ml physiologischer NaCl gelöst. Die Keimzahlen eines ml betragen:

E. coli = 2 · 10⁷ Keime/ml

L. bifidus = 8 · 10⁵ Keime/ml

L. acidophilus = 3,2 · 10⁷ Keime/ml

Charge 9402: 20 Kapseln wurden in 100 ml physiologischer NaCl gelöst. 1 ml Aufschwemmung enthält demnach folgende Keimzahlen:

E. coli = 1,2 · 10⁶ Keime/ml

L. bifidus = 6 · 10⁵ Keime/ml

L. acidophilus = 1,2 · 10⁶ Keime/ml

Die Gesamtheit der mit den OMNIFLORA - Aufschwemmungen immunisierten Tieren werden im folgenden als " OMNIFLORA-Kollektiv" bezeichnet.

Während die Impfstoffmengen für die Kollektive "Coli 2380" und "Coli BEHRING" in allen Versuchen konstant gehalten wurden, mußte die Impfstoffdosierung für die mit OMNIFLORA - Aufschwemmungen immunisierten Tiere in den ersten drei Versuchen variiert werden. Die Charge 9325 in Versuch I wurde so in physiologischer NaCl gelöst, daß jede Maus dieses Kollektivs 8,2 · 10⁹ Colikeime nach 10-maliger oraler Immunisierung erhielt. Diese Keimmenge entsprach der Impfstoffkonzentration des Coli 2380- und Coli - BEHRING - Kollektivs, sodaß ein Immunitätsvergleich durch den im OMNIFLORA - Kollektiv verabreichten apathogenen E. coli Nr. 007 möglich gemacht werden konnte. Die mit der OMNIFLORA - Aufschwemmung verabreichten Bifidus - und Acidophiluskeime wurden nicht berücksichtigt. Diese Impfdosis vertrugen die Mäuse leider nicht,

obwohl in Vorversuchen die Apathogenität der Acidophilus- und Bifiduskeime, sowie des E. coli Nr. 007 bei oraler und intraperitonealer Gabe bis zu 10^{11} Keimen nachgeprüft worden ist. Bis zum Infektionstag waren von den in Versuch 1 immunisierten Tieren 50% verstorben, sodaß die Immunisierungsdosis verändert werden mußte.

In Versuch 2 wurde die Charge 9214 benutzt. Durch die veränderte Keimzahl der Charge, sowie durch das geänderte Auflösungsverfahren erhielten die immunisierten Tiere als Gesamtimpfdosis $1,1 \cdot 10^4$ Colikeime, 10^5 Bifiduskeime und $4,8 \cdot 10^9$ Acidophiluskeime. Diese Impfdosis wurde von den Tieren gut vertragen. Keine Maus starb zwischen Versuchsbeginn und Infektionstag. Es soll erwähnt werden, daß in diesem Versuch als Einzigem eine Charge benutzt wurde, in der die Bact. bifidum - Keimzahl höher war als die der Normalcolikeimzahl.

Die Charge 9308 wurde in Versuch 3 benutzt. Hier war wieder wie in allen Versuchen, die Anzahl der Colikeime höher als die der Bifiduskeime. Die Tiere erhielten nach 10-maliger Immunisierung $2 \cdot 10^8$ Colikeime, $8 \cdot 10^5$ Bifiduskeime und $3,2 \cdot 10^7$ Acidophiluskeime als Gesamtimpfdosis.

Für die Versuche 4 - 8 wurde die Charge 9402 benutzt. Aus der Keimzahl sowie dem geänderten Auflösungsverfahren, ergeben sich folgende Keimzahlen als Gesamtimpfdosis

E. coli	1,2	$\cdot 10^7$	Keime/ml
L. bifidus	6	$\cdot 10^6$	Keime/ml
L. acidophilus	1,2	$\cdot 10^7$	Keime/ml

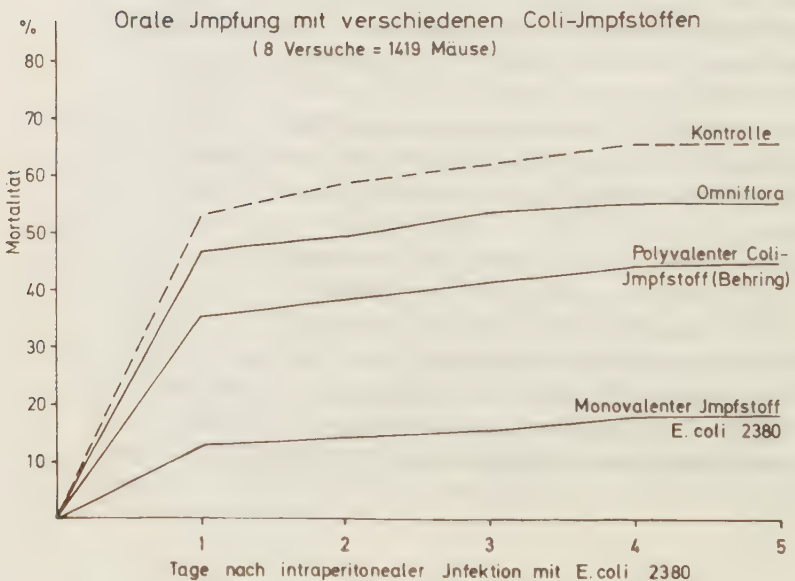
Die beschriebenen Impfstoffe a, b, und c wurden für die Grundversuche benutzt. Die Impfstoffe der anderen Versuchsreihen, die aus den Grundversuchen folgten, sollen bei deren Beschreibung besprochen werden.

B) Versuchsdurchführung

Jede Maus der 3 Kollektive erhielt in 12 Tagen, in einem Turnus von 2 mal 5 Tagen, die durch 2 Tage Pause unterbrochen wurden, einmal täglich 0,25ml des betreffenden Impfstoffes mit der Schlundsonde zugefüttert. Am 9. Tag nach der letzten oralen Impfung erhielt jede geimpfte Maus und jede Kontrollmaus 0,1ml einer 6- stündigen unverdünnten, frischen Brühekultur des Dyspepsiecoli - Stammes 2380 intraperitoneal injiziert. Die Wirkung der intraperitonealen Infektion wurde an der prozentualen Absterbeordnung über 5 Tage geprüft.

C) Ergebnisse

In der I. Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob Mäuse mit oral verabreichten OMNIFLORA Suspensionen einen höheren Schutz vor einer intraperitonealen Dyspepsiecoliin-



fektion besitzen als Vergleichsgruppen mit oral verabreichten monovalenten und polyvalenten Impfstoffgaben. Der durch die unterschiedlichen Impfstoffe erzielte Schutz gegenüber einer Dyspepsiecoliinfektion ist aus der Abbildung 1 zu entnehmen. In Tabelle 1 findet man die Ergebnisse der Einzelversuche. Die Spalten geben neben der Versuchsnummer, die Anzahl der je Versuch infizierten, sowie die absolute Zahl der je Versuch gestorbenen Mäuse nach Infektion und die prozentuale Absterberate an. Die Spalte 5 gibt den Wirkungsindex der erfolgten Immunisierung wieder, der sich aus der Formel
$$\frac{(b - a) \cdot 100}{b} = W \quad (b = \text{Mor-}$$

talität der Kontrolltiere in %; $a = \text{Mortalität der immunisierten Tiere in \%}$) ergibt.

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß mit der spezifischen Immunisierung ein hoher Schutz vor einer intraperitonealen homologen Infektion erzielt werden kann. Die Mortalität konnte von 63,80% bei den Kontrollen auf 18,01% gesenkt werden. Die beobachtete Differenz beträgt $D_b = 45,79\%$ und ist damit größer als die nach KOLLER (33) berechnete größtzulässige Zufallsdifferenz $D_z = 9,8\%$, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%. Die Echtheit beträgt $E = D_b : D_z = 4,7$; der Wirkungsindex $W = 71,77$. Der Wirkungsindex entspricht der von LIETZ und RAETTIG angegebenen Größe, die dieselben Versuchsanordnungen benutzten.

Auch für das "Coli - BEHRING - Kollektiv" konnte der Infektionsschutz vor einer intraperitonealen Dyspepsiecolibelastung bei der Maus statistisch gesichert werden.

TABELLE: 1

oral L. coli 2380 (hitzeinaktiviert)					oral Coli - Behring - Suspension				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index
1	50	12	24,00	58,62	1	50	29	58,00	-----
2	50	6	12,00	83,78	2	50	20	40,00	45,94
3	50	1	2,00	94,72	3	42	7	16,66	56,08
4	39	12	30,96	63,66	4	41	10	24,40	71,36
5	44	11	25,08	67,00	5	47	24	50,98	32,92
6	39	2	5,14	93,45	6	41	16	39,04	37,57
7	46	6	13,08	70,45	7	35	19	55,34	-----
8	43	15	34,95	48,48	8	45	33	73,59	-----
Summe:	361	65	18,01	71,77	Summe:	351	158	45,04	29,38
oral Omniflora - Suspension					Kontrolle				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	
1	25	16	64,00	-----	1	50	29	58,00	
2	50	27	54,00	32,44	2	50	37	74,00	
3	48	3	10,04	73,53	3	37	14	37,94	
4	50	31	62,00	27,23	4	47	40	85,20	
5	38	25	66,00	13,15	5	50	38	76,00	
6	39	33	84,51	-----	6	41	24	78,56	
7	45	24	53,32	-----	7	43	19	44,27	
8	47	32	67,84	-----	8	47	32	67,84	
Summe:	342	191	55,84	12,62	Summe:	355	273	53,80	

Die beobachtete Mortalitätsdifferenz zwischen den polyvalent immunisierten "BEHRING - Kollektiv" und dem Kontrollkollektiv beträgt $D_b = 18,76\%$. Nach KOLLER (33) ergibt sich als größtzulässige Zufallsdifferenz $D_z = 9,9$. Die Echtheit beträgt $E = 1,9$; der Wirkungsindex $W = 29,38$. Hiermit wurde das Ergebnis am Tiermodell bestätigt, daß SCHREIBER an vier Berliner Kinderkliniken im doppelten Blindversuch an Säuglingen und Kleinkindern nachgewiesen hatte. SCHREIBER (63) hat für seinen Versuch denselben "BEHRING - Impfstoff" verwendet.

Im Gegensatz zu den beiden erwähnten Kollektivgruppen, konnte die Signifikanz beim OMNIFLORA - Kollektiv nicht gesichert werden. Die Mortalitätssenkung, die durch orale Gaben von OMNIFLORA - Suspensionen erzielt werden konnte, beträgt gegenüber dem Kontrollkollektiv $D_b = 8,1\%$. Da sich die größtzulässige Zufallsdifferenz mit $D_z = 9,9$ errechnet, ergibt sich für den Echtheitsgrad E ein Wert unter 1. ($E = D_b : D_z = 0,8$)

Die Annahme, daß orale OMNIFLORA - Suspensionen Mäuse vor einer intraperitonealen Dyspepsiecolibelastung schützen könnten, stützten sich einerseits auf die Ergebnisse von MOCHMANN und seinen Mitarbeitern (48), die Mäuse durch orale Normalcoligaben vor intraperitonealen Dyspepsiecoliinfektionen schützen konnte sowie auf die Hypothese, daß zwischen *Lactob. bifidus* und *E.*

coli ein Antagonismus besteht. Die von MOCHMANN und Mitarbeitern verwendete Impfdosis an Normalcoli liegt jedoch höher, als die Normalcoliimpfdosen der OMNIFLORA-Suspensionen.

Betrachtet man den Versuch 3 (Tabelle 1), so fällt auf, daß in diesem Versuch die Mortalität in allen Versuchsgruppen, auch bei den Kontrollen, sehr niedrig ist. Da die Mortalitätssenkung nicht nur die immunisierten Tiere, sondern auch die Kontrollen betrifft, muß der mortalitätssenkende Effekt in der Infektion zu suchen sein. Die hier zur Infektion benutzte Keimaufschwemmung muß geringer virulent gewesen sein, als die Keimaufschwemmungen, die in den anderen sieben Versuchen benutzt wurden. Auffällig an diesem Versuch ist der hohe Wirkungsindex von $W = 73,59$ der mit oralen Gaben von OMNIFLORA erzielt werden konnte. Es ergibt sich die Frage, ob durch orale Gabe von OMNIFLORA - Suspensionen Mäuse vor intraperitonealen E. Coli 2380 - Infektionen geschützt werden können, wenn man eine geringere Infektionsdosis wählt.

Um diese Vermutung zu verifizieren, standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: 1.) Verminderung der Infektionsdosis 2.) Erhöhung der Impfdosis.

Eine Erhöhung der Impfdosis war, wie Versuch 1 schon zeigte, nicht möglich. Andererseits sollte die Infektionsdosis nicht verändert werden, da in Belastungsversuchen

die Möglichkeit besteht, durch Berechnung der Wirkungsindices, die Wirksamkeit verschiedener Immunantworten, die durch unterschiedliche Impfstoffe erreicht werden, miteinander zu vergleichen. Voraussetzung hierfür ist eine identische Versuchsanordnung, vor allem eine konstante Belastung. Alle bisher am E. coli - Maus - Modell erarbeiteten Ergebnisse wurden mit hohen Infektionsdosen erzielt.

Da die Infektionsdosis nicht verändert werden sollte, die Impfdosis durch Konzentrierung der OMNIFLORA - Aufschwemmung nicht möglich war, wurde das Präparat OMNIFLORA in seine drei Bakterienarten zerlegt. Jeweils 20 Mäuse wurden mit Dosen von 10^{10} Keimen Bact. bifidum, Lactob. acidophilus und E. Coli Nr. 007 immunisiert und mit E. Coli 2380 intraperitoneal infiziert, analog der I. Versuchsreihe. Jeweils 20 Mäuse erhielten darüber hinaus, die sich aus allen drei Keimen ergebenden möglichen Kombinationen auf übliche Weise mit der Schlundsonde über 10 Tage gefüttert.

Diese Kombinationen waren:

- 1.) Lactob. acidophilus und E. coli Nr. 007
- 2.) E. coli Nr. 007 und Lactob. Bifidus
- 3.) Lactob. bifidus und Lactob. acidophilus

Eine weitere Versuchsgruppe von 20 Mäusen wurde mit dem im OMNIFLORA befindlichen Bindemittel auf oralem Wege im üblichen Sinne immunisiert. 20 Mäuse erhielten OMNI-

FLORA oral wie in den Grundversuchen als Kontrolle.

In den Impfstoffen lagen die Bakterien in lyophilisierter Form vor. Die Keimzahlen der Impfstoffe lagen zwischen 10^9 bis 10^{11} Keimen/ml. Mit dieser Versuchsanordnung sollte geprüft werden ob bei höher dosierten Einzelkomponenten des Präparates OMNIFLORA ein Schutz gegen die oben verwendete massive Infektionsdosis besteht.

Das erstaunliche Ergebnis dieses Versuches war, daß von den mit lyophilisierten Bact. bifidum immunisierten Tieren keines starb, während in den anderen Versuchsgruppen die Mortalität zwischen 50 und 90 % schwankte. Der Versuch wurde 2 mal mit je 50 Mäusen je Versuchsgruppe wiederholt. Leider ging in beiden Versuchen die Infektion durch Verlust der Virulenz des zur Infektion benutzten Keimes (E. coli 2380) nicht an. Durch zahlreiche Mäusepassagen konnte später die Virulenz zurückgewonnen werden. Im weiteren (II. Versuchsreihe) wurde jedoch auf eine Reduplikation des oben geschilderten Versuches verzichtet und versucht, den Nachweis des jetzt sehr wahrscheinlich gewordenen Antagonismus zwischen Bact. bifidum und Dyspepsiecoli direkt zu erbringen. Der oben geschilderte Versuch besitzt, wenn man die schwankenden Ergebnisse der I. Versuchsreihe bedenkt, wenig Aussagekraft und soll deshalb nur als Vorversuch betrachtet werden.

II. Versuchsreihe

A) Material und Methoden

1) Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden wieder weiße NMRI Mäuse beiderlei Geschlechts benutzt, mit einem Durchschnittsgewicht von 14 - 18 g zu Versuchsbeginn. 5 Versuchsgruppen wurden gebildet. Die äußeren Bedingungen entsprachen der ersten Versuchsreihe.

2) Impfstoffe

a) Der Dyspepsiecoli - Impfstoff wurde analog der I. Versuchsreihe hergestellt. Die Keimzahl betrug auch hier $2,5 \cdot 10^9$ Keime/ml die eine Maus als Gesamtimpfdosis erhielt.

b) In allen Versuchen wurde der Lactobacillus bifidus Longum var. Longum B benutzt, der auch den Bifidusan- teil des Präparates OMNIFLORA darstellt. Dieser Lactob. bifidus ist in Säuglingsdarmfloren nachgewiesen. Der Lact. bifidus - Impfstoff wurde folgendermaßen hergestellt: Traubenzuckerbouillon wurde mit Lact. bifidus beimpft und 24 Std. bei 37°C bebrütet. Die bewachsene Kulturbouillon wurde zentrifugiert, dem Zentrifugat Schutzkolloid zugegeben und das Gemisch homogenisiert. Eine Keimzahlbestimmung des Bakterien - Schutzkolloid - Homogenisates wurde vor der Lyophilisierung durchgeführt. Das Lyophilisat wurde gewichtsmäßig bestimmt und die pro Gramm enthaltene Keimzahl errechnet. Sie betrug $1,9 \cdot 10^{12}$ Keime/g. Als Lebendanteil ergab sich 2,79 %, als Totanteil des Lyophilisates 97,21 %. Die Trocken- masse wurde zum Zweck der oralen Immunisierung in physio- logischer NaCl - Lösung suspendiert, die Suspension an- schließend mit Hilfe eines "Ultra - Thurex" homogenisiert.

Die drei gleichzeitig durch unterschiedliche NaCl - Zugabe hergestellten Suspensionen, enthielten die Keimzahlen $1,9 \cdot 10^{11}$, $1,9 \cdot 10^{10}$, $1,9 \cdot 10^9$ Keime/ml.

B) Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung ist mit der ersten Versuchsreihe gleich. - Die Tiere wurden in 5 Versuchsgruppen von etwa 50 Mäusen eingeteilt. 4 Versuchsgruppen erhielten die oben beschriebenen Impfstoffe, die 5. Versuchsgruppe wurde nicht immunisiert und diente als Kontrolle. Immunisierung und Infektion wurden, wie in der ersten Versuchsreihe beschrieben, durchgeführt.

C) Ergebnisse

Die Resultate der 3 Belastungsversuche sind aus Tabelle 2 A - F und Abbildung 2 zu entnehmen. Tabelle A - C stellen die Ergebnisse dar, die durch die orale Verfütterung der unterschiedlichen Keimsuspensionen von Bact. bifidum und nachfolgender E. coli - Infektion erzielt wurden. Die Summenergebnisse dieser 3 Versuchsgruppen (Tabelle 2 A - C) liegen dicht beieinander in der natürlichen Streubreite, sodaß die Zusammenfassung gerechtfertigt erscheint.

Die Mortalität von 56,66 % bei den unbehandelten Kontrollmäusen konnte auf 19,33 % bei den spezifisch immunisierten Tiere gesenkt werden. Die beobachtete Differenz beträgt damit 37,33 %. Die höchstzulässige Zufallsdifferenz beträgt nach KOLLER $D_z = 15,1$ % und ist damit um das $E = D_b : D_z = 2,4$ fache größer als D_b . Hieraus er-

TABELLE: 2 A - F

oral Bifidus 10 ¹¹ Lyophilisat					oral E. coli 2380 (hitzeinaktiviert)				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index
21	50	12	24,00	34,61	21	50	7	14,00	73,07
22	49	19	38,76	43,00	22	50	12	24,00	64,70
23	50	14	28,00	44,00	23	50	10	20,00	60,00
Summe:	149	45	30,20	46,69	Summe:	150	29	19,33	65,88
oral Bifidus 10 ¹⁰ Lyophilisat					Kontrolle				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	
21	49	10	20,40	60,76	21	50	26	52,00	
22	50	21	42,84	37,00	22	50	34	68,00	
23	50	15	30,00	40,00	23	50	25	50,00	
Summe:	149	46	30,87	45,51	Summe:	150	85	56,66	
oral Bifidus 10 ⁹ Lyophilisat					Bifidusvers. gr. zusammen (A+B+C)				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index
21	49	10	20,40	60,76	A	149	45	30,20	46,69
22	50	15	30,00	55,88	B	149	46	30,87	45,51
23	49	13	28,52	42,96	C	148	38	25,67	54,69
Summe:	148	38	25,67	54,69	Summe:	446	129	28,92	48,97

D

E

F

A

B

C

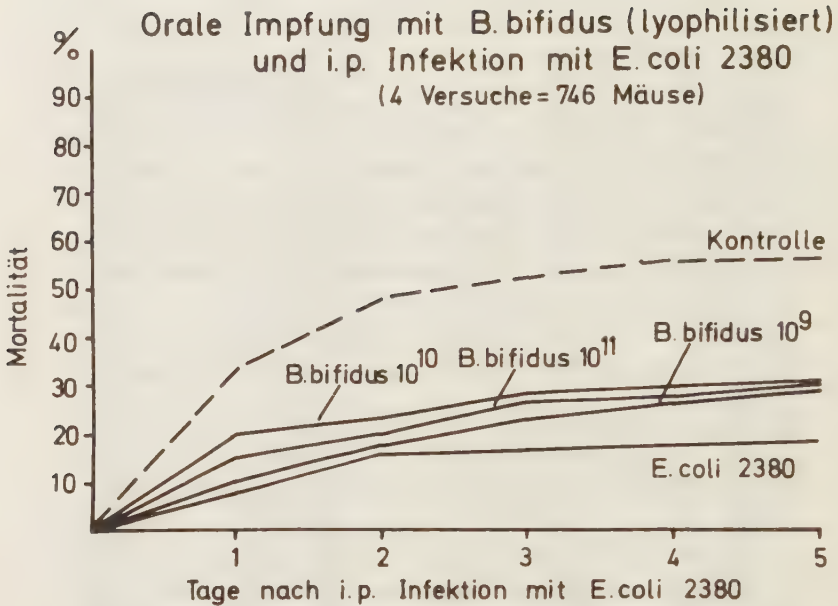


Abb. 2

gibt sich eine hohe statistische Signifikanz. Der Wirkungsindex beträgt 65,88.

Die Absterberate aller mit *Bact. bifidum* behandelten Mäuse konnte auf 28,92 % gegenüber 56,66 % bei den Kontrolltieren gesenkt werden, liegt aber um 9,59 % höher als bei dem mit hitzeinaktivierten *Coli* 2380 -

Keimen immunisierten Tierkollektiv. Der Wirkungsindex beträgt $W = 48,97$. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Anzahl des spezifisch immunisierten und dem mit *Bact. bifidum* behandelten Tierkollektiv, ergibt sich eine höchstzulässige Zufallsdifferenz von $D_z = 6,8 \%$. Der Echtheitsgrad beträgt $E = 4,1$.

In der I. Versuchsreihe hatte Versuch 3 in der OMNIFLORA - Gruppe gezeigt, daß eventuell eine oral verabreichte OMNIFLORA - Suspension einen Schutz gegen eine intraperitoneale *E. coli* 2380 - Infektion bewirkt, wenn die Infektionsbelastung gering gehalten wird. Versuchsreihe II läßt vermuten, daß die Ursache dieser Wirksamkeit in dem lyophilisierten Bifidusanteil zu suchen ist und nicht in dem gleichzeitig mit der OMNIFLORA - Suspension verabreichten Normalcolianteil (*E. coli* Nr. 007), wie die geschilderten Vorversuche zeigten. Eine Klärung dieser Frage soll weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.

Als Ergebnis der II. Versuchsreihe muß festgestellt werden, daß die verwendeten *Bact. bifidum* - Impfstoffe ei-

nen hohen Schutz gegen eine DC - 2380 - Infektion bei der Maus bewirkten. Die Wirksamkeit dieses Schutzes liegt höher als alle anderen bisher am E. coli - Maus - Modell verwendeten unspezifischen Impfstoffe. LIETZ und RAETTIG (35) konnten durch orale Verabreichung hitzeinaktivierter Dyspepsiecolibakterien und nachfolgender heterologer Infektion (E. coli oral : B 5 : H 19); E. coli Infektion O 111 : B 4 : H 12 = E. coli 2380) einen gerade noch signifikanten Schutz vor einer heterologen intraperitonealen Dyspepsiecolibelastung nachweisen. Die Wirksamkeit betrug 23,8. MOCHMANN erreichte dagegen durch orale Immunisierung mit

1.) DC O 55 2.) DC O 127 3.) DC O 26 und 4.) einem Normalcoli, eine Wirksamkeit gegenüber einer intraperitonealen heterologen E. coli - Infektion (ebenfalls E. coli 2380) von 1.) 1,8 , 2.) 6,8 , 3.) 12 und 4.) 20,1.

Die Überlegenheit des lyophilisierten Bact. bifidum - Impfstoffes zeichnet sich nicht nur gegenüber monovalenten unspezifischen Impfstoffen ab, sondern auch gegenüber polyvalenten. Die I. Versuchsreihe hatte gezeigt, daß mit Hilfe des polyvalenten BEHRING - Impfstoffes gegenüber einer intraperitonealen Dyspepsie - Belastung eine Wirksamkeit von 29,38 erreicht werden kann. Die Wirksamkeit der Bact. bifidum - Impfstoffe betrug maximal 54,69 und ist damit beinahe doppelt so groß. Abschließend sei nochmals da-

rauf hingewiesen, daß die Infektionsbelastungen der an dieser Stelle erwähnten Versuche immer gleich groß gewesen sind.

Ob der in dieser Versuchsreihe nachgewiesene Schutz gegen eine intraperitoneale DC - Infektion durch die besondere Herstellungsart der verwendeten Impfstoffe (lyophilisierte Impfstoffe setzen sich aus einem Tot- und Lebendanteil zusammen) hervorgerufen wurde, sollte in zwei neuen Versuchsreihen geprüft werden.

III. Versuchsreihe

A) Material, Methode und Versuchsdurchführung

Die III. Versuchsreihe unterscheidet sich von der II. Versuchsreihe nur in Bezug auf die Impfstoffherstellung. Die "Bifidus - Impfstoffe" wurden vor dem Vorgang der Lyophilisation auf 100°C erhitzt, sodaß es sich um hitzeinaktivierte, lyophilisierte Impfstoffe handelte. Die Gesamtimpfdosis pro Maus betrug $3 \cdot 10^{11}$, $3 \cdot 10^{10}$ und $3 \cdot 10^9$ Keime/ml je nach Versuchsgruppe.

B) Ergebnisse

Die Ergebnisse der III. Versuchsreihe sind aus Tabelle 3 und Abbildung 3 zu entnehmen. Auch hier konnte wieder die statistische Signifikanz der homolog infizierten Tiere gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden, da $D_b = 40,27\%$ und $D_z = 13,5\%$ beträgt. $E = D_b : D_z$ ist um das 2,99 fache größer als D_b . Der Wirkungsindex beträgt 60,10. Die Mortalitätsenkungen, die gegenüber den nicht immunisierten Tieren durch lyophilisierte und gleichzeitig hitzeinaktivierte Bact. bifidum - Impfstoffe erzielt werden konnten, unterscheiden sich, obwohl Konzentrationsunterschiede in Bezug der Keimzahlen 1 : 100 vorlagen, nur minimal. Deshalb wurden wie in der II. Versuchsreihe die Ergebnisse der Wirksamkeit der 3 Bact. bifidum - Impfstoffe zusammengefaßt (Tabelle 3 F). Die Mortalität konnte von 67,00% auf 52,50% gesenkt werden. Da $D_b = 14,5\%$ beträgt, D_z aber unter Berücksichtigung der verschiedenen Tierzahlen 11,2%, konnte auch in dieser Versuchsgruppe ein signifikanter Schutz vor einer intraperitonealen Dyspeptocoliinfektion nachgewiesen werden. Die Echtheit beträgt $E = D_b : D_z = 1,29$, der Wirkungsindex 21,64.

Orale Impfung mit *B. bifidus* (lyophilisiert und hitzeinaktiviert) und i.p. Infektion mit *E. coli* 2380

(4 Versuche = 997 Mäuse)

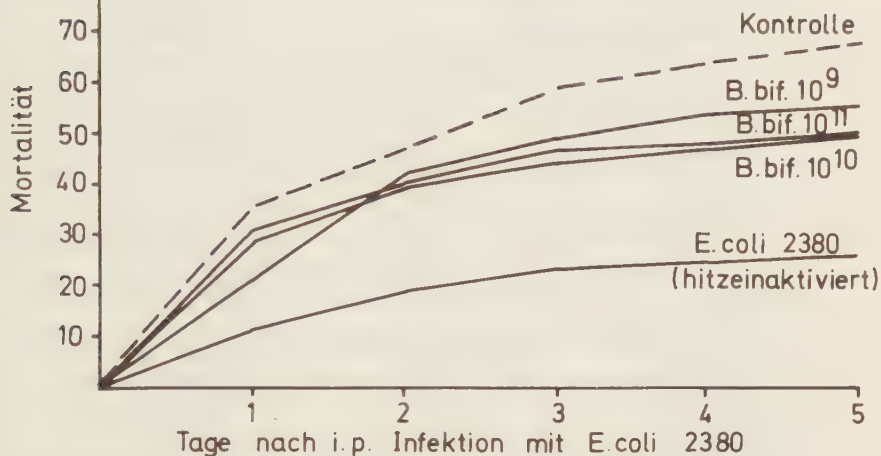


Abb. 3

Die lyophilisierten und gleichzeitig hitzeinaktivierten *Bifidus*impfstoffe bewirkten im Vergleich zu den lyophilisierten *Bifidus*impfstoffen der II. Versuchsreihe nur einen geringen Schutz vor einer intraperitonealen Dyspepsiebelastung. Die Differenz der Wirkungsindizes beträgt 27,33. Die Impfstoffe der II. und III. Versuchsreihe unterscheiden sich nur darin, daß der lyophilisierte *Bifidus*impfstoff der II. Versuchsreihe in der III. Versuchsreihe für drei Minuten auf 100°C erhitzt wurde. Eine solche Behandlung bewirkt keine Änderung der Antigenität und damit Immunogenität von O - Antigenen. Die beiden

TABELLE: 3 A - F

oral Bifidus 10 ¹¹ (hitzeinakt. u. Lyophil.)					oral E. Coli 2380 (hitzeinaktiviert)				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index
24	50	24	48,00	38,46	24	50	14	28,00	64,10
25	49	33	67,32	6,36	25	49	9	18,47	74,34
26	50	15	30,00	37,50	26	50	15	30,00	37,50
27	50	31	62,00	11,42	27	50	15	30,00	57,14
Summe:	199	103	51,75	22,76	Summe:	199	53	26,73	60,10
oral Bifidus 10 ¹⁰ (hitzeinakt. u. Lyophil.)					Kontrolle				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	
24	50	30	60,00	23,08	24	50	39	78,00	
25	49	24	49,34	31,47	25	50	36	72,00	
26	50	17	34,00	29,16	26	50	24	48,00	
27	50	29	58,00	17,14	27	50	35	70,00	
Summe:	199	100	50,20	24,00	Summe:	200	134	67,00	
oral Bifidus 10 ⁹ (hitzeinakt. u. Lyophil.)					Bifidusgruppen zusammen (A-C)				
Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index	Versuchsnummer	Anzahl	davon gestorb. absol.	in %	W. - Index
24	50	34	68,00	12,82	A	199	103	51,75	22,76
25	50	32	64,00	11,11	B	199	100	50,20	24,00
26	50	17	34,00	29,16	C	200	111	55,50	17,16
27	50	28	56,00	20,00	Summe:	598	314	52,50	21,64
Summe:	200	111	55,50	17,16					

A

B

C

D

E

F

Bifidusimpfstoffe müßten dieselbe Wirksamkeit haben, wenn ihr Wirkungsmechanismus auf einer Antigen - Antikörper - Reaktion im Sinne einer Paragglutination mit den O - Antigenen des zur Infektion benutzten E. coli 2380 - Stammes beruhen sollte. Die unterschiedlichen Wirkungsindices der zwei Bifidusimpfstoffe beweist somit, daß die "bifidogene Wirksamkeit" gegen E. coli 2380 - Infektionen bei der Maus durch einen anderen Wirkungsmechanismus als der einer Paragglutination erklärt werden muß.

Durch die Hitzeeinwirkung aus den lyophilisierten Bifidusimpfstoff, wird dessen Lebendanteil abgetötet. Es ist denkbar, daß die bessere bifidogene Wirksamkeit des nur lyophilisierten Bifidusimpfstoffes durch diesen Lebendanteil verursacht wird. Die Wirksamkeit wird damit auf ein Stoffwechselprodukt des Bact. bifidum zurückzuführen sein. Dagegen kann der Abfall der bifidogenen Wirksamkeit des lyophilisierten und gleichzeitig hitzeinaktivierten Impfstoffes darauf zurückgeführt werden, daß mit diesem abgetöteten Impfstoff nur eine konstante Menge dieses Stoffwechselproduktes den Mäusen oral zugeführt wurde, die einen höheren Schutz vor den massiven intraperitonealen Dyspepsiecolinfektionen nicht gewährleisten konnte. Bei Richtigkeit dieser Hypothese müßten oral zugeführte, virulente Bifidusimpfstoffe einen noch besseren Schutz gegen E. coli 2380 Infektionsbelastungen bei der

Maus erbringen.

In der IV. Versuchsreihe soll der tierexperimentelle Nachweis mit Hilfe der Hämagglutinationsreaktion und dem PCA - Test erbracht werden, daß zwischen lyophilisierten Bifidusimpfstoffen und E. coli 2380 Immunseren keine Paragglutination vorliegt.

IV. VersuchsreiheA) Indirekte Hämagglutinationsreaktion

1. Sechs Meerschweinchen wurden mit 1 ml eines 1 : 5 mit Phosphatpuffer verdünnten lyophilisierten Bifidusimpfstoffes parenteral immunisiert. Am 4. Tag wurden die Meerschweinchen entblutet und das Serum gewonnen. Das Serum wurde anschließend eine halbe Stunde auf 56°C erhitzt.
2. Herstellung der O - Antigene des Dyspepsiecolistammes 2380 erfolgte als Harnstoffextrakte nach den Angaben von BRODHAGE (9). Von den erhaltenen O - Antigenen wurde eine 0,06 %ige Lösung hergestellt.
3. Frische Hammelbluterythrozyten wurden chromiert und dreimal in Veronalpuffer (ph = 7,6) gewaschen und sedimentiert.
4. Gleiche Volumina von 2. und 3. wurden gemischt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die chromierten und beladenen Erythrozyten sedimentiert und in Puffer gewaschen. Gleiche Volumina des Erythrozytensediments und normales Meerschweinchen-serum wurden 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und die Erythrozyten wieder abzentrifugiert.
5. In der Verdünnungsreihe, die von dem in 1. beschriebenen Serum hergestellt wurde, wurden die unter 3. beschriebenen und 1 : 4 mit Puffer suspensierten Erythrozyten zugegeben.
6. Die Ablesung der Verdünnungsreihe geschah nach 24 stündiger Bebrütung bei 37°C.

Ergebnis

Der Versuch verlief negativ. Es konnte in keinem Röhrchen eine Hämagglutination beobachtet werden. Ebenso verlief die umgekehrte Reaktion negativ bei der E. coli-O - Antiserum mit Lact. bifidus auf einen Objektträger verrieben wurde.

B) PCA - Test

Zwei Meerschweinchen wurden oral mit lebenden E. coli - 2380 10 mal immunisiert (2 ml pro Tag, Keimzahl: Meerschweinchen A = 10^7 Keime/ml, Meerschweinchen B = 10^9 Keime/ml). Nach 16 Tagen wurde das Serum gewonnen, und je zwei Ratten und zwei Meerschweinchen intrakutan als Quaddel in die rasierte Bauchhaut gespritzt. 2, 4 und 8 Stunden nach der Quaddelbildung wurden 10^6 lyophilisierte Bact. bifidus - Keime intravenös gespritzt.

Ergebnis

Der Versuch verlief ebenfalls negativ, da keine Rötung im Bereich der gesetzten Quaddeln beobachtet werden konnte. Damit wurde das Ergebnis des Hämagglutinationstestes durch den PCA - Test bestätigt. Die bifidogene Wirksamkeit oral verabreichter Bifidusimpfstoffe gegen E. coli 2380 Belastungen am E. coli - Maus - Modell kann somit nicht durch eine Paragglutinationsreaktion erklärt werden.

Diskussion

Aus dem Ergebnis der 1. Versuchsreihe geht hervor, daß das Präparat OMNIFLORA keinen Schutz vor einer massiven intraperitonealen Dyspepsiecolibelastung gewährleistet. Es wurde jedoch die Vermutung ausgesprochen, daß eventuell durch orale Gaben von OMNIFLORA - Suspensionen bei geringerer Infektionsbelastung ein Schutz vor i.p. Dyspepsiecolibelastungen nachweisbar ist.

Dies geht aus dem 3. Versuch der I. Versuchsreihe hervor und wurde bei der Besprechung der I. Versuchsreihe erläutert. Durch die nachfolgenden Versuchsreihen, in denen eine bifidogene Wirksamkeit gegen intraperitoneale Dyspepsiecolibelastungen nachgewiesen werden konnte, gewinnt diese Annahme an Wahrscheinlichkeit. Die Unwirksamkeit der Präparat - Suspension wird darin zu suchen sein, daß der Bifidusanteil im OMNIFLORA um etwa 5 Zehnerpotenzen geringer ist als in den später verwendeten Bifidusimpfstoffen.

Während für orale Gaben von OMNIFLORA - Suspensionen keine Wirksamkeit gegenüber massiven intraperitonealen Dyspepsiecoligaben bei der Maus erbracht werden konnten, gelang dies mit Hilfe lyophilisierter Bifidusimpfstoffe. Über diese bifidogene Wirksamkeit kann Folgendes ausgesagt werden:

I.) lyophilisierte Bifidusbakterien bewirken nach oraler Gabe einen besseren Schutz vor einer intraperitonealen Dyspepsiecolibelastung bei der Maus als dies durch polyvalente unspezifische Dyspepsiecoliimpfstoffe und Normalcoliimpfstoffe möglich ist (II. Versuchsreihe).

2.) Die Größe des damit zu erreichenden Schutzes entspricht dem eines monovalenten homologen Impfstoffes (II. Versuchsreihe).

3.) Die nachgewiesene bifidogene Wirksamkeit gegen

intraperitoneale Dyspepsiecolibelastungen ist nicht antigengebunden (IV. Versuchsreihe).

4.) Die bifidogene Wirksamkeit gegen eine intraperitoneale Dyspepsiecolibelastung bei der Maus ist geringer, wenn der Lebendanteil der lyophilisierten Impfstoffe durch Hitze inaktiviert wird (III. Versuchsreihe).

Damit wurde der Nachweis erbracht, daß die bifidogene Wirksamkeit gegen eine Dyspepsiecolibelastung, Ausdruck eines aktiven Geschehens von Seiten des Bact. bifidum ist.

Bei Untersuchung der Frage nach dem Wirkungsprinzip, muß man berücksichtigen, daß bei den Durchgeführten Versuchen die Bact. bifidum - Impfstoffe 10 mal oral verabreicht und erst 12 Tage nach Beendigung der Immunisierung die Infektion intraperitoneal gesetzt wurde. Der Impfstoff muß deshalb eine Wirkung über den Intestinaltrakt hinaus in die parenteralen Räume für mindestens 12 Tage gehabt haben.

Die Darmflora der Mäuse wurde weder vor, während noch nach den Versuchen untersucht. Es ist deshalb nicht

möglich eine Aussage darüber zu machen, ob die bifidogene Wirksamkeit der Impfstoffe gegen eine intraperitoneale Dyspepsiecolibelastung schon während der Immunisierung eingetreten ist und dann mindestens 12 Tage angehalten hat, oder ob es nach Ausbildung einer bifidushaltigen Darmflora gegen Ende der Immunisierungsphase zu einer kontinuierlichen Persorption oder Resorption von Stoffwechselprodukten gekommen und damit erklärbar ist. Der Nachweis, daß orale Gaben von Bifiduskulturen zu einer Resorption von Stoffwechselprodukten oder zur Persorption führen, wurde mit Hilfe radioaktiver Markierung von Bifiduskeimen, die oral verabreicht wurden, nachgewiesen (62).

Die empirisch gewonnene Vermutung der nachgewiesenen bifidogenen Wirksamkeit hat in der Vergangenheit zur Aufstellung einiger Hypothesen geführt:

MAYER (38,39,40,41) und BIRKENBACH (3) vermuteten im *Bact. bifidum* eine antibakteriell bzw. antibiotisch wirkende Substanz. Ihre Vermutung wird durch in vitro Versuche gestützt. Sie züchteten das sonst streng anaerobe *Bact. bifidum* in einer mit Hefeautolysat, Peosin und Pepton versetzten Milch unter halbaeroben Verhältnissen. Verschiedene Dyspepsiecolibakterien, Proteus, Pneumokokken, Typhus, Paratyphus und Ruhrbakterien, die zusammen mit den adaptierten Bifiduskulturen in die versetzte Milch überimpft wurden, kamen nicht zur Entwicklung. Kontrolluntersuchungen

ergaben, daß in Abwesenheit von *Bact. bifidum* die aufgezählten Kulturen in ihrem Wachstum nicht gehemmt wurden.

Dasselbe Prinzip konnte MAYER in vivo bei 2 Säuglingen nachweisen, die an einer Soorenteritis und einer Staphylokokkenenteritis litten. Durch Bildung einer künstlichen Bifidusflora mit Hilfe einer bifidogenen Säuglingsnahrung, konnten die Symptome der beiden Krankheitsbilder schnell zurückgedrängt werden.

Biochemische Untersuchungen zeigten, daß im *Bact. bifidum* alle essentiellen Aminosäuren außer Tryptophan zu finden sind. DITTMANN (12) wies nach, daß diese Aminosäuren an die Umgebung abgegeben werden. Diese Produktion von essentiellen Aminosäuren und den Stickstoffverbrauch durch das Bacterium wurde von MÜTING (45), zur Entlastung des Leberstoffwechsels, bei Lebercirrhotikern mit Erfolg als Therapie benutzt. Es ist denkbar, daß der durch das *Bact. bifidum* günstig beeinflusste Eiweiß - Stoffwechsel zu einer Steigerung der allgemeinen Abwehrkraft des Makroorganismus führt, ob dies tatsächlich zutrifft, ist ungewiß, soll aber bei der Diskussion des Wirkungsprinzips nicht unerwähnt bleiben.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus wurde von BRAUN (7) angegeben. Er beobachtete, daß Lysozym, im Ma-

gen - Darmtrakt ab pH 6 und höher inaktiviert wird. Da eine Bifidusflora einen Stuhl von pH 5 und niedriger bewirkt, wird durch diese spezielle Darmflora eine Inaktivierung des Lysozyms durch Hemmung des Lysozyminhibitors, der aus dem Pankreas stammen soll, verhindert. Deshalb gelang BRAUN der Nachweis von Lysozym auch nur im Stuhl von Brustmilch ernährten Säuglingen, nicht im Stuhl von älteren Kindern oder Erwachsenen, die eine andersgeartete Bifidusdarmflora besitzen. Durch Hemmung des Lysozyminhibitors durch eine *Bact. bifidum* Darmflora könnte es zur Resorption von Lysozym kommen und in den parenteralen Räumen wirksam werden.

Eine Abwägung der einzelnen Hypothesen entspräche Spekulationen. Eine spezielle Aussage über den Wirkungsmechanismus auf Grund der ausgeführten Versuche kann nicht gemacht werden. Weiteren Versuchen bleibt auch vorbehalten, ob die nachgewiesene bifidogene Wirksamkeit eine größere Breite besitzt, welche sich nicht nur auf den in den Versuchen verwendeten *Dyspepsiecolistamm* 2380 beschränkt, sondern auch auf andere *Coli*- und *Dyspepsiecolistämme*. Es wäre interessant nachzuprüfen, ob die Wirksamkeit auch am *E. coli* - *Pyelonephritis* - Modell bewiesen werden könnte.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) Adam, A. Die Entstehung der Bifidusflora.
Jb. d. Kinderhkl. 110, 186-204 (1925)

- 2) Besredka, A. Die lokale Immunisierung
Leipzig, J. A. Barth (1926)

- 3) Birkenbach, P. Symbiose - Versuche zwischen Bacterium
bifidum und Dyspepsiecoli unter Berücksichtigung der ph - Verhältnisse
Inaugural - Dissertation Homburg/Saar
1957

- 4) Bray, J. Isolation of antigenically homogenous
strains of Bact. coli neapolitanum from
summer diarrhoea of infants
J.of. Pathology 57, 239-247, 1945

- 5) Braun, O. H. Über die Bedeutung serologisch einheitlicher
Colistämme für die Entstehung
epidemischer Enteritis im Säuglingsalter.
Z. f. Hyg. 132, 548-573 (1951)

- 6) Braun, O. H. Untersuchungen über die Tierpathogenität
der Dyspepsiecolibakterien.
Resemann, G. Z. f. Hyg. 137, 581-610 (1953)
Stöckle, Ch.

- 7) Braun, O. H. Faecale Lysozymausscheidung bei Säuglingen.
Estratto dagli atti del II. Symposium Internazionale sul Lisozima
di Fleming
7. - 9. April 1961

- 8) Breuel, H. - P. Lokale Immunisierung mit nichtvermeh-

rungsfähigen Mikroorganismen oder
ihren Antigenen.

G. Fischer, Stuttgart 1969

- 9) Brodhage, H. Harnstoff - Extrakte aus gramnegativen Bakterien in der indirekten Hämagglutinationsreaktion. I. Mitteilung
Z. f. Hyg. 148,94-104, (1961/62)

- 10) Brückner, G. Über orale Immunisierungsversuche
Z. f. Imm. - Fschg. 8,439-445 (1910)

- 11) Camerer, W. Neue Wege in der Dysbakterie - Behandlung (OMNIFLORA)
Münch. Med. Wochr. 103,1971-1975, (1961)

- 12) Dittmann, J. Zum Stoffwechsel des Bacterium bifidum (Lactobacillus bifidus)
Mayer, J. B. Z. f. Kinderhkl. 94,130-140 (1965)
Wolf, M.

- 13) Freter, R. Detection of Coproantibody and its formation after parenteral and oral immunization of human volunteers
J. infect. Diss. 111,37 (1962)

- 14) Giles, C. An outbreak of infantile gastro - enteritis in Aberdeen.
Sangster, G. J. of Hyg. 46,1 (1948)

- 15) Giles, C. Epidemic Gastro - Enteritis of infants in Aberdeen during 1947
Sangster, G. Arch. Diss. Childh. 24,45, (1949)
Smith, I.

- 16) Goldschmidt, R. Untersuchungen zur Ätiologie der Durch-

fallserkrankungen des Säuglings

Jb. d. Kinderhkl. 139,318-358 (1933)

17) Gwan, O. S.

Recherchez sur l'immunité antibacil-
laire (Premier Mémoire)

Z. f. Immun.- Fschg. 93,248-277 (1938)

18) Gwan, O. S.

Recherchez sur l'immunité antibacil-
laire (Deuxième Mémoire)

Z. f. Immun.- Fschg. 93,278-300 (1938)

19) Haenel, H.

Feldheim, G.

Zur Definition der normalen und gestör-
ten Darmflora des Erwachsenen (Eubiose-
Dysbiose)

Med. Welt 134-140 (1961,I)

20) Haenel, H.

Aspekte der mikroökologischen Beziehung
des Makroorganismus

Zbl. f. Bakt. I. Ref. 176,1-121 (1960)

21) Haenel, H.

Lutzky v., A.

Zur Mikroökologie des Dünndarmes und
des oberen Colon nach Untersuchungen
von punktiertem Darminhalt.

Med. Welt Nr. 8,370-373 (1961)

22) Heymann, G.

Das Properdinsystem und seine Bedeutung
zur Immunität und zur Abwehrlage des
Organismus.

Zbl. f. Bakt. I. Ref. 176,305-335 (1960)

23) Hirtzmann, M.

Neue Erkenntnisse über die Physiologie,
Pathologie und Therapie der mensch-
lichen Darmflora.

Erfahrungsheilkunde, Zeitschr. f. d.
tägl. Praxis, VIII. Heft 1 (1964)

- 24) Hoffmann, K.
Sauerbrei, H. Über die Stuhlflora von Frühgeborenen im Klinikmilieu bei Ernährung mit roher und gekochter Frauenmilch.
Z. f. Kinderhkl. 81,367-378 (1958)
- 25) Jandel, G. Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der oralen Typhusimmunsierung. I. Mitteilung
Z. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 34-44 (1965)
- 26) Jandel, G. Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der oralen Typhusimmunsierung. II. Mitteilung
Z. med. Mikrob. Immunol. 152,211-215 (1965)
- 27) Kety, I. Modellversuche an Säuglingsmäusen mit einem enteropathogenen Coli - Stamm
Zbl. f. Bakt. I Orig. 194,332-341 (1964)
- 28) Kety, I. Passive Schutzversuche gegen die Infektion mit dem für Säuglingsmäuse pathogenen E. coli O 101 : K 30 - Stamm
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 200,235-241 (1966)
- 29) Kirby, A. C. Neonatal Diarrhoea and vomiting outbreaks in the same maternity unit
Lancet II 201-207, (1950)
- 30) Kludas, M. Züchtung von Lactobacillus bifidus in und auf einfachen Nährmedien
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 174,71-74 (1959)

- 31) Koller, S. Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag Darmstadt (1969) 4. Auflage
- 32) Krepler, P. Ätiologische Bedeutung des Bacterium coli O 111 : B 4 bei Säuglingsenteritiden
Zischka, W. Österr. Z. f. Kinderhkl. 7,89-110 (1952)
- 33) Kundralitz, K. Durch pathogene Colistämme bedingte Enteritiden im Säuglingsalter
Gross, H. Österr. Z. f. Kinderhkl. 8,305-325 (1953)
- 34) Kühn, E. Zum Pathomechanismus der Colidyspepsie
Raue, W. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 203,172-176 (1967)
Willnow, U.
- 35) Lietz, B. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. V. Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoli-Infektionen
Raettig, H. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 204,543-554 (1967)
- 36) Lodenkämpfer, H. Über das Problem der oralen Immunisierung
Wiener med. Wschr. 114,860 (1964)
- 37) Malyouth, G. Versuch einer Differenzierung beim Bacterium bifidum
Bauer, A. Klin. Wschr. 1950,451-452 (1950)

- 38) Mayer, J. B. Möglichkeiten einer physiologischen
antibiotischen Therapie beim Säugling
mit *Bakterium bifidum* (*Lactobacillus*
bifidus)
Msch. f. Kinderhkl. 114, 67-73 (1966)
- 39) Mayer, J. B. Entwicklung einer neuen Säuglingsnah-
rung mit *Thermobakterium bifidum*.
Ein Beitrag zur Säuremilchnahrung.
Z. f. Kinderhkl. 65, 293-318 (1948)
- 40) Mayer, J. B. Das antibiotisch wirksame Prinzip des
Bacteriums bifidum. In vitro Versuche
Fortschritte d. Inn. Med. '80, 585 (1962)
- 41) Mayer, J. B. Wechselbeziehung zwischen Diät, Darm-
flora und Viren.
Physik. Med. und Rehab. 10. Jg. 16-23
(1969)
- 42) Mochmann, H. Laboratoriumsversuche über die Möglich-
Ocklitz, H. W. keit einer oralen Immunisierung mit
Schmidt, F. einem Natriumdesoxicholalextrakt aus
Richter, U. *Dyspepsiecoli* - Stämmen.
Hering, L. VII. Mitteilung: Serumantikörper in der
indirekten Hämagglutinationsreak-
tion bei immunisierten und nicht
immunisierten Tieren.
Zbl. f. Bact. I. Orig. 208, 58-69 (1968)
- 43) Mochmann, H. Laboratoriumsversuche über die Möglich-
Ocklitz, H. W. keit einer oralen Immunisierung mit
Hering, L. einem Natriumdesoxycholalextrakt aus
Schmidt, E. F. *Dyspepsiecoli* - Stämmen.
Richter, U. V. Mitteilung: Die Gruppenspezifität

der Schutzwirkung und der Schutzeffekt einer bivalenten Immunisierung im aktiven Mäuseschutzversuch
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 206,63-71 (1968)

- 44) Mochmann, H. Laboratoriumsversuche über die Möglichkeit einer oralen Immunisierung mit einem Natriumdesoxycholatextrakt aus *Dyspepsiecoli* - Stämmen.
II. Mitteilung: Immunbiologische Eigenschaften. Die Antikörperbildung im Versuchstier und der passive Schutzversuch.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 203,307-334 (1957)
- 45) Müting, D. Normalisierende Wirkung einer *Bakterium-bifidum* - Milch auf den Eiweißstoffwechsel bei Lebercirrhose.
Reikowsky, H. Dtsch. med. Wsch. 93,1313-1319 (1968)
Escherich, W.
Klein, Ch.
Doenecke, D.
- 46) Ocklitz, H. W. Die Prophylaxe der *Dyspepsiecoli* - Infektion.
Mochmann, H. Dtsch. Gesundheitsw. 26,1226-1235
Hering, L. (1968)
Schmidt, E. F.
- 47) Ocklitz, H. W. Oral immunization of mice with a soluble protective antigen obtained from an enteropathogenic serotypes of *E. coli*
Hering, L. Nature, 214,1053-1054 (1967)
- 48) Ocklitz, H. W. Die Bedeutung der pathogenen *Colistämme* (*Dyspepsiecoli*) für die akuten Durchfallserkrankungen des Säuglings
Stuttgart: Enke (1954)

- 49) Peter, A. Beobachtung über parenterales Auftreten oral verabfolgter fütterungsapathogener Mikroorganismen.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 201,85-90 (1966)
- 50) Piringer, W. A. Orale Immunisierung weißer Mäuse durch Dyspepsiecoli
Zbl. f. Bact. I. Orig. 196,463 (1965)
- 51) Raettig, H. Erste Tierversuche zur oralen Immunisierung mit inaktivierten Virus
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 204,170-171 (1966)
- 52) Raettig, H. Die lokale Immunisierung mit inaktivierten Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr)
Zbl. f. Bakt. I. Ref. 183,1-54 (1962)
- 53) Raettig, H. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
I. Mitteilung: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis - Infektion
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 193,398-410 (1964)
- 54) Raettig, H. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
II. Mitteilung: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis - Infektion
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 197,368 (1965)

- 55) Raettig, H. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
 III. Mitteilung: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Immunisierung der Maus gegen S.-enteritis
 Zbl. f. Bakt. I. Orig. 203,478 (1967)
- 56) Raettig, H. Neue Modellversuche zur Infektionsabwehr des Darmes.
 Zbl. f. Bakt. I. Orig. 198,206-211 (1965)
- 57) Raettig, H.
 Buse, A. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
 Zbl. f. Bakt. I. Orig. 204,221 (1967)
- 58) Raettig, H. Mechanism of oral Immunization with inactivated Mikroorganism
 S. Karger Verlag, Basel 1969 (im Druck)
- 59) Raettig, H. Möglichkeiten der oralen Immunisation mit inaktivierten Mikroorganismen
 Boll. Ist. Sier. Milan 47,321-328 (1968)
- 60) Rauss, K.
 Kéty, I. Beiträge zur antagonistischen Wirkung der Coli - Flora des Darmkanals
 Zbl. f. Bakt. I. Orig. 177,161-175 (1960)
- 61) Rohmann, A.
 Burmeister, W.
 Mayer, J. B. Papierchromatographische Untersuchung des Aminosäuregehaltes von Bact. bifidum
 Zschr. Kinderhkl. 85,210-216 (1965)

- 62) Salahi - Arab Der Übergang der Aminosäure Methionin aus dem Bakterienleib des Bacterium bifidum in den Wirtsorganismus nach Einbringen von lebenden methioninbeladenen Bifidumbakterien in den Magen der Ratte (Ein Beitrag zum Stoffwechselfaustausch zwischen Mikroorganismus und Makroorganismus)
Inaugural - Dissertation Homburg/Saar 1968
- 63) Schreiber, A. K. Ein Feldversuch zur oralen Impfung mit inaktivierten Dyspepsie - Colibakterien im Säuglings- und Kleinkindesalter.
Inaugural - Dissertation FU/Berlin 1968
- 64) Stellmacher, W. Die Seuchenimpfung in der Veterinärmedizin
Mh. Vet.- Med. 20,370 (1965)
- 65) Stinebring, W. R. Patterns of interferon appearance in mice injectes with bacteria or bacterial endotoxin
Youngner, I. S. Nature 204,712 (1964)
- 66) Taylor, J. Discussion on infantile gastro - enteritis
Proc. Roy. Soc. Med. 44,516 (1951)
- 67) Tomotari Mitsuoka Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 210,52-64 (1969)

Zusammenfassung

Auf Grund der vier geschilderten Versuchsreihen kann Folgendes ausgesagt werden:

- 1) orale Gaben von OMNIFLORA - Suspensionen können Mäuse nicht vor einer massiven intraperitonealen Dyspepsiecoligabe schützen. Es ist möglich, daß dieser Schutz bei weniger massiver Infektionsbelastung nachweisbar wird (I. Versuchsreihe), da:
- 2) orale Gaben von lyophilisierten Bifidusbakterien, ein Bestandteil des Präparates OMNIFLORA, einen Schutz vor intraperitonealen Dyspepsiecolibelastungen bei Mäusen bewirken, der bedeutend größer ist, als der Schutz, der durch polyvalente unspezifische Dyspepsiecolimpfstoffe und Normalcolimpfstoffe erreichbar ist (II. Versuchsreihe).
- 3) Die bifidogene Wirksamkeit gegen eine intraperitoneale Dyspepsiecolibelastung bei der Maus ist nicht antigengebunden (III. und IV. Versuchsreihe).
- 4) Die bifidogene Wirksamkeit gegen eine intraperitoneale Dyspepsiecolibelastung bei der Maus ist geringer, wenn der Lebendanteil des lyophilisierten Bifidusimpfstoffes durch Hitze inaktiviert wird (III. Versuchsreihe).

Herrn Professor Raettig danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Robert Koch - Institut sowie für die vielfältigen Anleitungen, Ratschläge und Verbesserungen bei der Abfassung der Arbeit.

Den Behring - Werken Marburg / Lahn sowie der MED Fabrik chemisch pharmazeutischer Präparate J. Carl Pflüger Berlin, schulde ich Dank für die Herstellung und großzügige Überlassung der Impfstoffe. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Weise für die Klassifizierung des verwendeten Lactob. bifidus nach dem von Tomotari Mitsuoka angegebenen Schema.

Nicht zuletzt bin ich auch den MTA Frau B. Ganze und Frau A. Vogelberg, die mich bei der Durchführung der Versuche unterstützten, erheblich zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Am 10. 6. 1941 wurde ich als Sohn des Rechtsanwaltes Dr. Heinz Prehl und seiner Ehefrau Lisbeth geb. Gläßer geboren. Ab 1948 besuchte ich in Leipzig die Grundschule. Nach der Flucht meiner Eltern aus der DDR setzte ich den Grundschulbesuch in Berlin fort. Im März 1962 legte ich an der Walther - Rathenau - Schule in Berlin Grunewald das Abitur ab und begann anschließend eine 2- jährige Praktikantenzeit in einer Apotheke. Im Herbst 1962 brach ich diese Ausbildung ab und ließ mich an der medizinischen Fakultät der FU immatrikulieren. Im August 1969 bestand ich das medizinische Staatsexamen. Anschließend war ich am Robert Koch - Institut, in der Chirurgischen Abteilung des Gertraudenkrankenhauses, der Frauenklinik des Klinikum Steglitz und der I. Inneren Abteilung des städtischen Lynarkkrankenhauses in Berlin, als Medizinalassistent tätig.

